

# Antibiotika-Resistenzgene als Marker in gentechnisch veränderten Pflanzen

## Zusammenfassung

Antibiotika-Resistenzgene bakteriellen Ursprungs können bei Transformationsexperimenten mit Pflanzen als Marker-Gene benutzt werden, um bereits in einem sehr frühen Stadium die erfolgreiche Transformation nachzuweisen. Von den rund 1300 Freisetzungsvorhaben in der EU seit 1991 waren rund 800 Projekte mit transgenen Pflanzen, die Antibiotika-Resistenzgene enthielten. Neben *amp*, *kan* und *hph* wurde hauptsächlich *nptII* als Marker-Gen verwendet. Von den 14 transgenen Pflanzen, deren Inverkehrbringen EU-weit genehmigt worden ist, enthalten sieben keine Antibiotika-Resistenzgene, fünf das *nptII* und zwei das *amp* (bzw. einen Teil davon).

Die Wahrscheinlichkeit der Übertragung von Antibiotika-Resistenzgenen aus dem transgenen Pflanzenmaterial auf Mikroorganismen wird als sehr gering eingestuft, ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Inwieweit sich aus einer solchen Übertragung eine veränderte Situation in Bezug auf die Verbreitung des jeweiligen Antibiotika-Resistenzgens herleiten läßt, ist vor dem Hintergrund seines heutigen natürlichen Auftretens sowie in Bezug auf den therapeutischen Einsatz der relevanten Antibiotika zu erwägen. Bei Verwendung von *nptII*, *amp*, *kan* oder *hph* als Marker-Gene in transgenen Pflanzen ist nicht davon auszugehen, daß sich diese Antibiotika-Resistenzen weiter ausbreiten und damit ein zusätzliches

Gefährdungspotential für Mensch oder Tier darstellen.

In einem Ausblick werden drei alternative Transformationsmethoden ohne den Einsatz von Antibiotika-Resistenzgenen kurz erläutert.

In der traditionellen Pflanzenzüchtung werden Pflanzen aufgrund von besonderen, ohne wesentliche Hilfsmittel erkennbaren Eigenschaften ausgewählt, von denen man aus Erfahrung weiß, daß sie mit anderen, mehr auf die Nutzung durch den Menschen orientierten Merkmalen gekoppelt sind. Derartige phänotypische Marker dienen der schnellen und effektiven Selektion von Nachkommen.

Analog werden für die Transformation von Pflanzen die dazu verwendeten DNA-Konstrukte in etlichen Fällen zusätzlich mit Marker-Genen gekoppelt, um nach dem eigentlichen Transformationsexperiment diejenigen Pflanzenzellen sicher und schnell identifizieren zu können, in deren Genom das eingebrachte DNA-Konstrukt erfolgreich inseriert worden ist. Ist dem jeweiligen Marker-Gen ein prokaryotischer Promoter vorgeschaltet, so kann sich die Marker-gestützte Selektion auf mit dem-

selben DNA-Konstrukt transformierte Bakterien (z.B. *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens*) beschränken, die zur Vorbereitung des eigentlichen Transformationsexperiments mit den Pflanzenzellen benötigt werden<sup>1</sup>. Aus den erfolgreich transformierten Pflanzenzellen werden vollständig entwickelte Pflanzen regeneriert.

Als Marker-Gene sind Antibiotika-Resistenzgene bakteriellen Ursprungs gebräuchlich. Es ist leicht einzusehen, daß durch ihren Einsatz der experimentelle Zugang geschaffen wird, um bereits in einem sehr frühen Stadium die erfolgreiche Transformation durch das selektierbare Merkmal Antibiotika-Resistenz nachweisen zu können. Andererseits hat die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen als Marker in transgenen Pflanzen auch erheblich dazu beigetragen, eine öffentliche Diskussion

<sup>1</sup>Auf die Frage der Spezifität von prokaryotischen bzw. eukaryotischen Promotoren kann hier nicht eingegangen werden. Es sei aber in diesem Zusammenhang auf die Publikation von [1] hingewiesen.

Prof. Dr. Dr. Brandt  
Zentrum Gentechnologie, Robert Koch-Institut,  
Wollankstraße 15–17, D-13187 Berlin und Institut  
für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie,  
Königin-Luise-Straße 12–16, D-14195 Berlin

P.Brandt

## Antibiotic resistance genes as marker genes in transgenic plants

### Summary

Antibiotic resistance genes of bacterial origin can be used as marker genes for transformation experiments with plants in order to detect positive transformants at a very early stage. Since 1991 about 1300 deliberate releases of transgenic plants were performed in the EU, 800 thereof with antibiotic resistance genes. Beside *amp*, *kan* and *hph* mainly *nptII* was the marker gene of choice. 14 transgenic plants have been approved for placing on the market within the EU member states. Thereof seven transgenic plants do not contain antibiotic resistance genes, five transgenic plants have incorporated *nptII* and two transgenic plants have incorporated *amp* (in one case a diminished part of *amp* only).

The possibility for the transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms has been estimated to be very low, but cannot be excluded. Whether such gene transfer can substantially increase the dissemination of the antibiotic resistance gene in question has to be considered in relation to its natural dissemination and its therapeutical use. It cannot be expected that the use of *nptII*, *amp*, *kan* or *hph* as marker genes in transgenic plants will increase the dissemination of these antibiotic resistance genes and will pose an additional risk potential.

In an outlook three transformation methods without using antibiotic resistance genes are described.

## Leitthema Antibiotikaresistenz

über die Frage zu entfachen, ob diese Antibiotika-Resistenzgene zum Beispiel beim Verrotten der transgenen Pflanzen im Boden oder beim Verzehr von Lebensmitteln, die aus transgenen Pflanzen hergestellt worden sind, von Bakterien des Bodens bzw. des Magen-Darm-Traktes aufgenommen werden können (Horizontaler Gentransfer) und ob daraus ein Risiko für Mensch und Tier abzuleiten ist [2, 3, 4].

### Welche Antibiotika-Resistenzgene werden als Marker-Gene in transgenen Pflanzen verwendet?

Bevor man über ein solches Risiko diskutiert oder seine Möglichkeit erwägt, sollte zunächst festgestellt werden, um welche Antibiotika-Resistenzgene es sich bei den Marker-Genen, die bei der Transformation von Pflanzen verwendet werden, handelt. Seit 1991 sind rund 1300 Freisetzungsvorhaben mit gentechnisch veränderten Pflanzen im Bereich der EU-Mitgliedstaaten gemeldet worden (Stand: November 1998). Davon enthielten die gentechnisch veränderten Pflanzen von mehr als 850 Freisetzungsvorhaben *nptII* als Marker-Gen; bei weiteren 17 Freisetzungsvorhaben wurde *amp*, bei weiteren 5 *kan* und bei 1 *hph* verwendet.

An der bloßen Anzahl der Freisetzungsvorhaben mit gentechnisch veränderten Pflanzen von 1991 bis 1998 läßt

sich aufgrund der verschiedenen Laufzeiten der einzelnen Freisetzungsvorhaben nicht ermesen, ob es in diesen acht Jahren möglicherweise eine zeitliche Präferenz für diese vier Antibiotika-Resistenzgene gegeben hat und ob ihre Anwendung als Marker-Gene quantitativ unverändert anhält. Bezieht man die verschiedenen Laufzeiten der einzelnen Freisetzungsvorhaben mit ein, indem man die Optionen auf Freisetzungsexperimente mit gentechnisch veränderten Pflanzen pro Jahr aufsummiert (eine Option bedeutet ein Freisetzungsexperiment während einer Vegetationsperiode), so wird deutlich, daß der Schwerpunkt der Optionen auf Freisetzungsexperimente mit gentechnisch veränderten Pflanzen, welche *amp* als Marker-Gen enthielten, in den Jahren 1994 und 1995 lag und daß die wenigen Optionen auf Freisetzungsexperimente mit gentechnisch veränderten Pflanzen, die *kan* als Marker-Gen enthalten, sich auf die Jahre 1996 bis 2000 erstrecken (Abb. 1).

Ein völlig anderes Bild zeigt sich für die Freisetzungsexperimente mit gentechnisch veränderten Pflanzen, die *nptII* als Marker-Gen enthalten (Abb. 2). Die Anzahl der Optionen auf Freisetzungsexperimente mit derartigen transgenen Pflanzen nimmt von 1992 bis 1997 nahezu gleichmäßig zu. Im Verhältnis zur Anzahl der Optionen aller Freisetzungsexperimente ergibt sich interessanterweise, daß der Anteil an transgenen Pflanzen ohne Antibiotika-Resi-

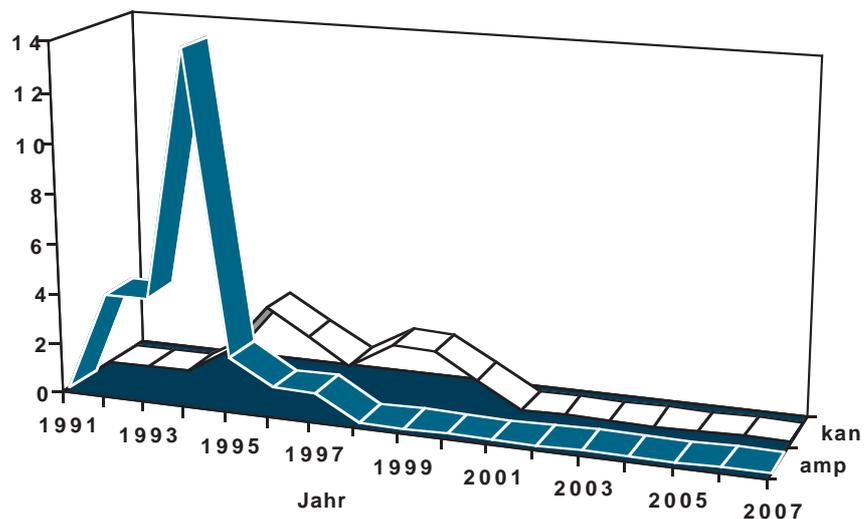
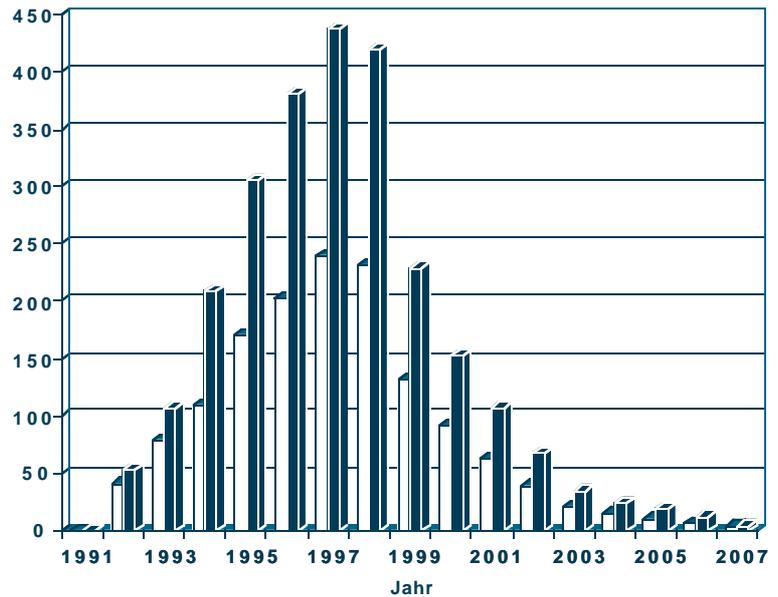


Abb. 1 ► Anzahl der Optionen auf Freisetzungsexperimente mit transgenen Pflanzen, die als Marker-Gen *amp* bzw. *kan* enthalten, in dem Zeitraum von 1991 bis 2007. (Stand: Oktober 1998; Quelle: <http://fb5.rki.de>)

Abb. 2 ► Anzahl aller Optionen auf Freisetzungsexperimente mit transgenen Pflanzen (schwarze Säulen) sowie der Optionen auf Freisetzungsexperimente mit transgenen Pflanzen, die als Marker-Gen *nptII* enthalten (weiße Säulen), in dem Zeitraum von 1991 bis 2007. (Stand: Oktober 1998; Quelle: <http://fb5.rki.de>)



stenzgene in dem Zeitraum von 1991 bis 1994 auf etwa 40 % ansteigt und über die folgenden Jahre bis 1998 auch dabei verbleibt (Abb. 3). Die bislang vorliegenden Optionen auf Freisetzungsexperimente bis zum Jahr 2006 sprechen nicht gegen diesen bisherigen Trend. Für den Bereich der EU-Mitgliedstaaten sind bislang dreizehn Genehmigungen für das Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Pflanzen ausgesprochen worden, von denen sieben keine Antibiotika-Resistenzgene, fünf das *nptII* und

zwei das *amp* (bzw. Teile davon) enthalten (Tabelle 1).

#### Herkunft, Verbreitung und medizinische Relevanz der *nptII*-, *amp*-, *kan*- und *hph*-Gene

Es wird immer wieder befürchtet, daß über die aus den transgenen Pflanzen hergestellten Lebensmittel, welche Antibiotika-Resistenzgene enthalten, diese auch auf human-pathogene Bakterien übergehen und damit die therapeuti-

sche Anwendung der relevanten Antibiotika in der Humanmedizin wirkungslos machen könnten. Diese verallgemeinernde Befürchtung wird durch eine Untersuchung der WHO [5, 6] dahingehend relativiert, daß im Falle von *nptII*, *kan* und *hph* auf den eingeschränkten medizinischen Anwendungsbereich der entsprechenden Antibiotika hingewiesen wird (Tabelle 2). Im Folgenden wird eine kurze Beschreibung der vier Antibiotika-Resistenzgene *amp*, *nptII*, *kan* und *hph* gegeben,

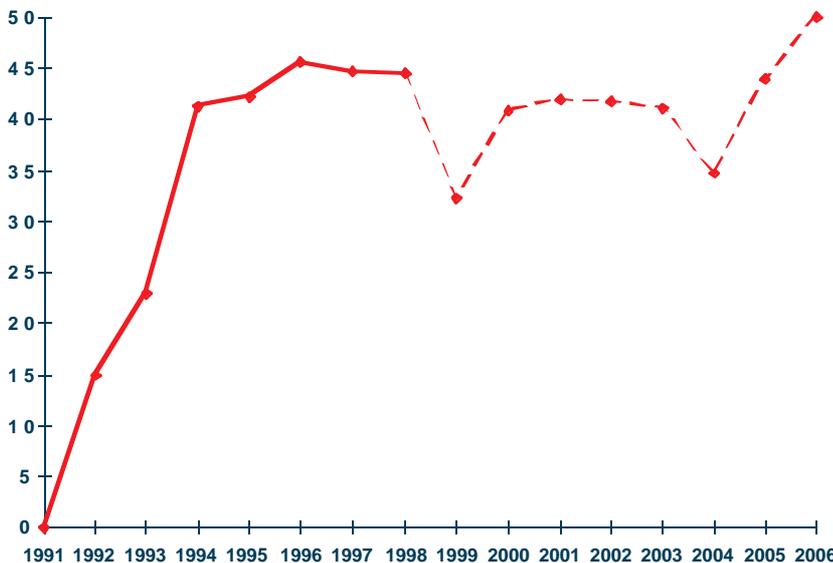


Abb. 3 ◀ Prozentualer Anteil der Optionen auf Freisetzungsexperimente mit transgenen Pflanzen ohne Antibiotika-Resistenzgenen an der Gesamtmenge an Optionen auf Freisetzungsexperimente mit transgenen Pflanzen für den Zeitraum von 1991 bis 2006. (Stand: Oktober 1998; Quelle: <http://fb5.rki.de>)

Tabelle 1

**Produkte aus dem Bereich der „Grünen Gentechnik“, für die ein Inverkehrbringen in der Europäischen Union genehmigt wurde**

Antragsteller	Pflanze	Gentechnische Veränderung	Beantragt/ Genehmigt	Antibiotika-Resistenzgen als Marker (ARG)
Seita	Tabak	HT	1993/1994	kein ARG
Plant Genetic Systems	Raps*	MS, HT	1994/1996	nptII
Novartis	Mais	IR, HT	1994/1997	amp
Bejo Zaden BV	Radicchio	MS	1994/1996	nptII
Monsanto	Soja	HT	1994/1996	kein ARG
Plant Genetic Systems	(a) Raps*	MS, HT	1995/1997	nptII
	(b) Raps*	MS, HT	1995/1997	nptII
AgrEvo	Raps	HT	1995/1998	nptII
AgrEvo	Mais	HT	1995/1998	amp (nv)
Monsanto	Mais	IR	1995/1998	kein ARG
Northrup	Mais	IR	1996/1998	kein ARG
Florigene	Nelke**	VB	1996/1998	kein ARG
Florigene	Nelke	VL	1997/1998	kein ARG
Florigene	Nelke**	VB	1997/1998	kein ARG

\* bzw. \*\*=transgene Pflanzen, die aus verschiedenen Transformationsexperimenten hervorgegangen sind und deren Inverkehrbringen daher auch separat beantragt und genehmigt wurde

amp=Ampicillin-Resistenzgen; nptII=Resistenz gegen Antibiotika der Neomycin-Gruppe; nv=nicht vollständig; HT=Herbizid-Toleranz; IR=Insekten-Resistenz; MS=Männliche Sterilität; VB=Veränderung der Blütenfarbe; VL=Verlängerung der Haltbarkeit als Schnittblume. (Stand: Oktober 1998; Quelle: <http://www.fb5.rki.de>)

soweit sie für die oben angesprochene Befürchtung von Belang ist:

#### Das amp-Gen

Das *amp*-Gen stammt aus dem Transposon Tn3 [7]. Mit *amp* (synonym zu *bla*<sub>(TEM-1)</sub>) wird das Gen für die TEM-1 β-Laktamase bezeichnet [8], die eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelt. TEM-1 ist die am weitesten verbreitete β-Laktamase. Etwa die Hälfte der klinischen *E.coli*-Isolate besitzen gegenwärtig eine Ampicillin-Resistenz. Diese ist zu etwa 90% durch den β-Laktamase-typ TEM1 bedingt [9]. TEM-1 zeigt gegenüber neueren Cephalosporinen eine sehr geringe Aktivität und ist durch β-Laktamase-Hemmer wie Clavulansäure oder Tazobactam inhibierbar [8]. Der Gebrauch von Ampicillin ohne geeignete β-Laktamase-Hemmer ist nur noch bei vorhergehender Resistenztestung angebracht. Trotzdem wird Ampicillin nicht nur bei Infektionen durch Enterokokken, sondern auch bei Infektionen

durch *Haemophilus influenzae* weiterhin als Mittel der Wahl betrachtet.

#### Das nptII-Gen

Das *nptII*-Gen stammt aus dem Transposon Tn5 [10] und kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase. Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglykosid-Antibiotika katalysiert und sie damit inaktiviert. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus [11]. Zu den Substraten der APH(3') II-Enzyme zählen die Antibiotika Kanamycin<sup>2</sup>, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin. Das in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsame Gentamicin und sonstige Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme [12, 13, 14].

#### Das kan-Gen

Das *kan*-Gen stammt aus dem Transposon Tn5 [15] und kodiert für eine Phosphotransferase, die Kanamycin durch Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe inaktiviert. Die fast ubiquitäre Verbreitung einer Kanamycin-Resistenz sei hier exemplarisch durch die Ergebnisse einer Untersuchung belegt [16], der zufolge ein Großteil der aus Ackerböden isolier- und kultivierbaren Mikroorganismen resistent gegen Kanamycin ist (Tabelle 3). Allerdings haben jüngere Untersuchungen gezeigt, daß nicht in jedem Fall allein von dem phänotypischen Befund auf den Genotyp geschlossen werden darf [17].

<sup>2</sup>Siehe auch den Hinweis über die Verbreitung von Kanamycin-Resistenzen in Mikroorganismen des Bodens [16, 17] im nächsten Abschnitt über die Eigenschaften des *kan*-Gens.

Tabelle 2

### Beispiele für bakterielle Antibiotika-Resistenzgene, die häufig als Marker-Gene in gentechnisch veränderten Organismen verwendet werden (verändert nach [4]; aus [5])

Marker-Gen	Herkunft	Antibiotikum	Verwendung
Kanamycin-Resistenz	Escherichia coli	Kanamycin Paromomycin Geneticin	Begrenzter Einsatz in der Humanmedizin
Hygromycin-Resistenz	Streptomyces hygroscopicus	Hygromycin	Nur Einsatz in der Veterinärmedizin
Streptomycin-Spectinomycin-Resistenz	Escherichia coli	Streptomycin Spectinomycin	Begrenzter Einsatz in der Humanmedizin
Gentamicin-Resistenz	Escherichia coli	Gentamicin	Einsatz in der Humanmedizin
Phleomycin-Resistenz	Streptoalloteichus hindustanus	Phleomycin Bleomycin	Begrenzter Einsatz in der Tumorthherapie

#### Das hph-Gen

Das *hph*-Gen kodiert für eine Hygromycin-Phosphotransferase. Diese inaktiviert spezifisch das Antibiotikum Hygromycin durch Phosphorylierung [18]. Andere Aminoglycosid-Aminocyclitol-Antibiotika wie Kanamycin oder Geneticin werden nicht umgesetzt. Hygromycin wird in der Humanmedizin nicht verwendet.

#### Können die Marker-Gene auf Bakterien übertragen werden?

Es ist seit langem bekannt, daß opportunistische pathogene Bodenbakterien Resistenz(en) gegen Antibiotika erwerben können [12, 20]. Jedoch ist es bislang nicht gelungen, diesen Resistenz-Erwerb auf einen Horizontalen Gentransfer zurückzuführen [20, 21]. Die Wahrscheinlichkeit eines Horizontalen Gentransfers von Pflanzenmaterial auf Mikroorganismen wird als sehr gering eingestuft [22], ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Der Erfolg eines solchen Transfers, zum Beispiel im Tierpannen, im Magen-

Darm-Trakt von Säugetieren, in Silagen oder im Boden, würde von einer geordneten Abfolge von Einzelschritten abhängen [22]:

- ▶ Entlassung des Marker-Gens zusammen mit *ori* (origin of replication) in intakter Form aus der Pflanzenzelle
- ▶ Aufnahme durch kompetente Bakterien
- ▶ Ringschluß des DNA-Fragments in der Bakterienzelle zu einem funktionsfähigen plasmidartigen Replikon
- ▶ Erfolgreiche Expression des übertragenen Marker-Gens

Tabelle 3

#### Kultivierbare Mikroorganismen aus Bodenproben

Ort der Probenahme	Kultivierungsart			
	Nährstoffreich	Nährstoffreich/Kan	Nährstoffarm	Nährstoffarm/Kan
Köln	$1.8 \times 10^7$	$2.5 \times 10^6$	$1.8 \times 10^7$	$1.7 \times 10^6$
Braunschweig (Rübenfeld)	$4.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$	$3.9 \times 10^5$	$2.3 \times 10^4$
Braunschweig (Kartoffelfeld)	$3.8 \times 10^5$	$5.0 \times 10^3$	$4.5 \times 10^5$	$2.1 \times 10^3$
Braunschweig (Getreidefeld)	$1.6 \times 10^6$	$1.3 \times 10^4$	$2.7 \times 10^6$	$5.6 \times 10^3$
Braunschweig (Maisfeld)	$3.2 \times 10^5$	$2.1 \times 10^4$	$3.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$

Angaben in CFU/g Bodengewicht (CFU=colony forming units); Kan=Kanamycin-haltiges Medium (verändert nach [13])

Das gemeinsame Eintreffen dieser jeweils als sehr selten eingeschätzten Ereignisse macht einen häufigen Gentransfer der oben genannten Marker-Gene von Pflanzen auf Bakterien sehr unwahrscheinlich. Nach Berechnungen von Schlüter et al. [23] liegt die Wahrscheinlichkeit für eine derartige Übertragung bei  $2.0 \times 10^{-17}$ .

**„Es muß davon ausgegangen werden, daß eine Übertragung von Antibiotika-Resistenzgenen zwischen Bakterien mit höherer Wahrscheinlichkeit erfolgt als eine Übertragung von transgenem Pflanzenmaterial auf Bakterien [16, 20].“**

Wenn eine derartige Übertragung von Marker-Genen dennoch eintreten würde, müßte man dies vor dem Hintergrund des heutigen natürlichen Auftretens der oben genannten Antibiotika-Resistenzen in Bakterien bewerten. Ausgehend von der Tatsache der schon sehr weiten Verbreitung von *amp*, *nptII* und *kan* ist die Wahrscheinlichkeit als unbedeutend gering einzuschätzen, daß sich durch ihre Verwendung als Marker-Gene in transgenen Pflanzen die entsprechenden Antibiotika-Resistenzen weiter ausbreiten und damit ein zusätzliches Gefährdungspotential für Mensch oder Tier darstellen.

Es ist außerdem zu berücksichtigen, daß durch den vermehrten und „sorglosen“ Einsatz von Antibiotika zunehmend Antibiotika-Resistenzen auftreten und daß – auch ohne Gentechnik – beim Verzehr von Obst und Gemüse eine Vielzahl an Antibiotika-resistenten Mikroorganismen täglich aufgenommen werden, ohne daß bislang – aus Erfahrung – negative Auswirkungen festgestellt oder bekannt geworden sind.

## Ausblick

Unabhängig von der Frage, ob mit der Verwendung von Antibiotika-Resistenzen als Marker-Gene Risiken für Mensch und Tier verbunden sein können, sei darauf hingewiesen, daß in den letzten Jahren Verfahren entwickelt worden sind, welche die Etablierung transgener Pflanzen ohne Marker-Gene grundsätzlich möglich machen. Es ist aber auch durchaus möglich, daß im konkreten Einzelfall aufgrund der Eigenschaften der Kulturpflanze, die transformiert werden soll, diese Methoden nicht einsetzbar sind.

Beispielhaft soll hier auf drei dieser Verfahren kurz eingegangen werden:

1. In dem von Yoder und Goldsbrough 1994 beschriebenen Verfahren [24] wird das Marker-Gen aus dem Genom der transformierten Pflanzenzelle wieder entfernt, nachdem die Transformation mittels des Markers bestätigt worden ist. Dazu bedient man sich des Enzyms Cre aus dem Bakteriophagen P1. Cre katalysiert einen Rekombinationsvorgang, bei dem DNA-Fragmente zwischen zwei spezifischen Erkennungssequenzen von 34 bp ausgeschnitten werden. Um dieses System zu nutzen, müssen die Pflanzenzellen mit zwei Klonierungsvektoren transformiert werden, wobei der eine ein Konstrukt aus dem eigentlichen Zielgen sowie dem Marker-Gen ist, das von den Cre-Erkennungssequenzen eingerahmt wird, und der zweite das Cre-Gen enthält. Nach der Transformation führt die Expression von Cre dazu, daß das Marker-Gen aus der Pflanzen-DNA wieder ausgeschnitten wird. Nach Regeneration zur vollständigen Pflanze sind aus den Nachkommen diejenigen auszuwählen, die aufgrund der zufälligen Chromosomensegregation das Cre-Gen nicht mehr enthalten.

2. Eine japanische Arbeitsgruppe hat 1997 ein Selektionsverfahren mit Hilfe des Isopentenyltransferase-Gens *ipt* innerhalb des transposablen Elementes Ac vorgestellt [25], das im Ergebnis zu *ipt*-freien transgenen Pflanzen führt.
3. Joersbo und Okkels entwickelten 1996 ein „Positives Selektionsverfahren“ [26], das auf der Insertion des Gens für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) aus *E. coli* in das pflanzliche Genom beruht. In erfolgreich damit transformierten Pflanzenzellen hydrolysiert die GUS zugegebenes Benzyladenin zu Cytokinin, von dem die Regeneration zu vollständigen transgenen Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen abhängt.

## Literatur

1. Lewin A, Jacob D, Freytag B, Appel B (1998) **Gene expression in bacteria directed by plant-specific regulatory sequences.** *Transgenic Res* 7: 1–9
2. Brandt P (1995) **Transgene Pflanzen. Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien.** Birkhäuser-Verlag, Basel, S 306
3. Brandt P (1998) **Begleitforschung zu Freisetzungsexperimenten mit gentechnisch veränderten Pflanzen: »nice to know« oder »need to know«?** *Bundesgesundheitsbl* 12: 530–536
4. Sander mann H, Rosenbrock H, Ernst D (1997) **Horizontaler Gentransfer bei Herbizidresistenz? Der Einfluß der Genstabilität und Selektionsdruck.** In: Brandt P (Hrsg) *Zukunft der Gentechnik.* Birkhäuser-Verlag, Basel, S 209–220
5. **Health aspects of marker genes in genetically modified plants.** (1993) Report of the WHO workshop WHO/FNU/FOS/93.6; S 1–32
6. Brandt P (1997) **Gentechnik in der Lebensmittelherstellung.** In: Brandt P (Hrsg) *Zukunft der Gentechnik.* Birkhäuser-Verlag, Basel, S 153–165
7. Heffron F (1983) **Tn3 and its relatives.** In: Shapiro JA (Hrsg) *Mobile genetic elements.* Acad Press, New York, S 223–260

8. Sanders C, Sanders WE Jr (1992)  **$\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact.** Clin Infect Dis 15: 824–839
9. Livermore DM (1995)  **$\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance.** Clin Microbiol Rev 8: 557–584
10. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) **Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis.** Cell 27: 143–153
11. Nap JP, Bijvoe J, Stiekema WJ (1992) **Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants.** Transgenic Res 1: 239–249
12. Trieu-Cuot P, Arthur M, Courvalin P (1987) **Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes.** Microbial Sciences 4: 263–266
13. Davies JE (1991) **Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes.** In: Lorian V (Hrsg) Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, 3. Aufl. S 691–713
14. Simon GW, Stille W (1989) **Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis.** Schattauer, Stuttgart, New York, 8. Aufl.
15. Berg DE (1989) **Transposon Tn5.** In: Berg DE, Howe MM (Hrsg) Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington, D.C. S 185–210
16. Wendt-Potthoff K, Smalla K, Backhaus H, Landsmann J (1992) **Kanamycin-resistente Mikroorganismen ubiquitär in landwirtschaftlich genutzten Böden nachgewiesen.** Nachrichtenbl Deutsch Pflanzenschutzd 44: 101–104
17. Smalla K, van Overbeck LS, Pukall R, van Elsas JD (1993) **Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin resistant bacteria from different environments.** FEMS Microbiol Ecol 13: 47–58
18. Gritz L, Davies J (1983) **Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae.** Gene 25: 179–188
19. Courvalin P (1994) **Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria.** Antimicrob Agents Chemother 18: 1447–1451
20. Kidwell MG (1993) **Lateral transfer in natural populations of eukaryotes.** Annu Rev Genet 27: 235–256
21. Nielsen KM, Bones AM, Smalla K, van Elsas JD (1998) **Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event?** FEMS Microbiol Rev 22: 79–103
22. **Stellungnahme der ZKBSt zum Ampicillin-resistenz-Gen in gentechnisch verändertem Mais.** (1997) Robert Koch-Institut, S 1–3
23. Schlüter K, Futterer J, Potrykus I (1995) **„Horizontal“ gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (Erwinia chrysanthemi) occurs, if at all, at an extremely low frequency.** Biotechnol 13: 1094–1100
24. Yoder J, Gouldsbrough AP (1994) **Transformation systems for generating marker-free transgenic plants.** Biotechnol 12: 263–267
25. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997) **Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene.** Proc Nat Acad Sci USA 94: 2117–2121
26. Joersbo M, Okkels FT (1997) **A novel principle for selection of transgenic plant cells: Positive selection.** Plant Cell Reports 16: 219–221